

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003787

International filing date: 04 March 2005 (04.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-060426  
Filing date: 04 March 2004 (04.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 28 April 2005 (28.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2004年 3月 4日

出願番号  
Application Number: 特願 2004-060426

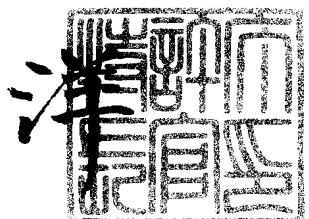
パリ条約による外国への出願に用いる優先権の主張の基礎となる出願の国コードと出願番号  
The country code and number of your priority application, to be used for filing abroad under the Paris Convention, is

出願人  
Applicant(s): 明治製菓株式会社

2005年 4月 13日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 14685601  
【提出日】 平成16年 3月 4日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12N 15/54  
【発明者】  
【住所又は居所】 埼玉県坂戸市千代田五丁目3番1号 明治製菓株式会社 ヘルス  
・バイオ研究所内  
【氏名】 中村 博文  
【発明者】  
【住所又は居所】 埼玉県坂戸市千代田五丁目3番1号 明治製菓株式会社 ヘルス  
・バイオ研究所内  
【氏名】 中根 公隆  
【発明者】  
【住所又は居所】 埼玉県坂戸市千代田五丁目3番1号 明治製菓株式会社 ヘルス  
・バイオ研究所内  
【氏名】 窪田 英俊  
【特許出願人】  
【識別番号】 000006091  
【住所又は居所】 東京都中央区京橋二丁目4番16号  
【氏名又は名称】 明治製菓株式会社  
【代理人】  
【識別番号】 100075812  
【弁理士】 吉武 賢次  
【氏名又は名称】  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100091487  
【弁理士】 中村 行孝  
【氏名又は名称】  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100094640  
【弁理士】 紺野 昭男  
【氏名又は名称】  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100107342  
【弁理士】 横田 修孝  
【氏名又は名称】  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 087654  
【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

62番、122番、128番、165番、221番、395番、および550番の少なくとも1つのアミノ酸残基において変異を有する配列番号2に記載のアミノ酸配列またはその相同体からなる、 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体。

【請求項 2】

変異が、置換である、請求項1に記載の変異体。

【請求項 3】

置換が、

62番のアミノ酸残基の、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群から選択される酸性アミノ酸への置換、

122番のアミノ酸残基の、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、およびバリンからなる群から選択されるアミノ酸への置換、

128番のアミノ酸残基の、アスパラギンおよびグルタミンからなる群から選択されるアミノ酸への置換、

165番のアミノ酸残基の、トリプトファン、フェニルアラニン、およびチロシンからなる群から選択される芳香族アミノ酸への置換、

221番のアミノ酸残基の、トリプトファン、フェニルアラニン、およびチロシンからなる群から選択される芳香族アミノ酸への置換、

395番のアミノ酸残基の、ロイシン、メチオニン、イソロイシン、およびバリンからなる群から選択されるアミノ酸への置換、および

550番のアミノ酸残基の、セリンおよびスレオニンからなる群から選択されるヒドロキシアミノ酸への置換

である、請求項2に記載の変異体。

【請求項 4】

配列番号2に記載のアミノ酸配列およびその相同体の、170番、300番、313番、および386番目の少なくとも1つのアミノ酸残基において、更に変異を有する、請求項1～3のいずれか一項に記載の変異体。

【請求項 5】

変異が置換である、請求項4に記載の変異体。

【請求項 6】

置換が、

170番のアミノ酸残基の、トリプトファン、フェニルアラニン、およびチロシンからなる群から選択される芳香族アミノ酸への置換、

300番のアミノ酸残基の、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシンおよびバリンからなる群から選択されるアミノ酸への置換、

313番のアミノ酸残基の、リジン、アルギニン、およびヒスチジンからなる群から選択される塩基性アミノ酸への置換、および

386番のアミノ酸残基の、リジン、アルギニン、およびヒスチジンからなる群から選択される塩基性アミノ酸への置換

である、請求項5に記載の変異体。

【請求項 7】

40番、379番、および381番の少なくとも1つのアミノ酸残基において変異を有する配列番号2に記載のアミノ酸配列またはその相同体からなる、 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体。

【請求項 8】

変異が、置換である、請求項7に記載の変異体。

【請求項 9】

置換が、

40番のアミノ酸残基の、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群から選択され

る酸性アミノ酸への置換、

379番のアミノ酸残基の、システインへの置換、および

381番のアミノ酸残基の、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、およびバリンからなる群から選択されるアミノ酸への置換

である、請求項8に記載の変異体。

【請求項10】

請求項1～9のいずれか一項に記載の $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項11】

請求項10に記載のポリヌクレオチドを含んでなる、組換えベクター。

【請求項12】

請求項11に記載の組換えベクターを含んでなる、形質転換体。

【請求項13】

請求項12に記載の形質転換体または請求項1～9のいずれか一項に記載の $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体とスクロースを接触させる工程を含んでなる、フラクトオリゴ糖の製造法。

【書類名】明細書

【発明の名称】 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体

【発明の属する技術分野】

【0001】

本発明は、ショ糖から特定のフラクトオリゴ糖を選択的かつ効率的に生成する $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体に関するもので、より詳細には、1-ケストースを効率的に生産する $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体およびニストースを効率的に生産する $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体に関するものである。

【従来の技術】

【0002】

一般にフラクトオリゴ糖は、ショ糖のフルクトースに1から3分子のフルクトースがC1とC2の位置で $\beta$ 結合しているオリゴ糖であり、難消化性の糖質で、腸内のビフィズス菌増殖促進作用、コレステロールなどの脂質代謝改善作用、難う蝕性、ミネラル吸収促進作用などの優れた生理機能を有することが見出されている。フラクトオリゴ糖は、天然には広く植物に分布しており、例えばタマネギ、アスパラガス、キクイモなどに含まれていることが知られているが、最近では、微生物由来の $\beta$ -フルクトフラノシダーゼの転移反応を利用してショ糖から大量に製造する技術が確立され、工業的に生産されている。現在フラクトオリゴ糖の工業的生産に利用されている $\beta$ -フルクトフラノシダーゼは、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 由来の菌体内 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼを利用している。

【0003】

当該 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子は、WO 97/34004号公報(特許文献1)に開示されている。しかし、当該 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼは、1-ケストース、ニストース、1-フルクトシルニストースの混合物としてフラクトオリゴ糖を生成するため、フラクトオリゴ糖はオリゴ糖混合物のシロップあるいは粉末として製造、提供されている。单一成分として、1-ケストースあるいはニストースを選択的かつ効率的に生産する $\beta$ -フルクトフラノシダーゼが得られれば、次のような有用性が存在する。すなわち、1-ケストースあるいはニストースを高純度に精製し、結晶化させることによって、フラクトオリゴ糖の生理機能を保持したまま、物性および加工特性上優れた特性を有する单一成分の結晶フラクトオリゴ糖を製造することが可能となる。

【0004】

一方、ショ糖を原料とした結晶1-ケストースの工業的製造法は、例えば、WO 97/21718号公報(特許文献2)に開示されている。すなわち、 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼをショ糖に作用させて1-ケストースに生成させ、クロマト分離法により1-ケストースを純度80%以上に生成した後、これを結晶化原液として純度95%以上の結晶1-ケストースを得る方法である。この方法に用いられる酵素の特性として、ショ糖から1-ケストースへの変換率が高いこと、ニストースの生成量が低いことが工業的製造法において求められている。また同様にニストースを单一成分として製造する場合には、ニストースへの変換率が高いこと、1-フルクトシルニストースの生成量が低いことが工業的製造法において求められている。

【特許文献1】WO 97/34004号公報

【特許文献2】WO 97/21718号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、フラクトオリゴ糖の单一成分、例えば1-ケストースあるいはニストースの製造に適するように反応特性が改善された $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体およびその遺伝子の提供をその目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、配列番号2のアミノ酸配列中の特定位置のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換した $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体が、1-ケストースあるいはニストースの製造に適する反応特性を有していることを見出した。

#### 【0007】

すなわち本発明の第一の態様によれば、62番、122番、128番、165番、221番、395番、および550番の少なくとも1つのアミノ酸残基において変異を有する配列番号2に記載のアミノ酸配列またはその相同体からなる、 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体およびその変異体をコードするポリヌクレオチドが提供される。本発明の第一の態様による変異体によれば、1-ケストースの効率的な製造が可能となる。

#### 【0008】

本発明の第二の態様によれば、40番、379番、および381番の少なくとも1つのアミノ酸残基において変異を有する配列番号2に記載のアミノ酸配列またはその相同体からなる、 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体およびその変異体をコードするポリヌクレオチドが提供される。本発明の第二の態様による変異体によれば、ニストースの効率的な製造が可能となる。

#### 【0009】

本発明による $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体を用いれば、フラクトオリゴ糖を製造する際の酵素反応液の糖組成を改善することが可能となり、フラクトオリゴ糖の単一成分の効率的な製造が可能となる。すなわち、本発明による $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体によれば、従来と比較して簡便に、かつ安価にフラクトオリゴ糖の単一成分の工業的製造が可能となる点で有利である。

#### 【発明の具体的説明】

#### 【0010】

##### $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体およびその遺伝子

本発明による第一および第二の態様による変異体は、配列番号2に記載のアミノ酸配列およびその相同体の特定のアミノ酸残基の少なくとも1つに変異が導入されてなるものである。

#### 【0011】

変異が導入されるアミノ酸残基の位置は、配列番号2のアミノ酸配列のアミノ酸残基番号と対応する。

#### 【0012】

本発明において「変異」とは、置換、欠失、および挿入を意味する。

#### 【0013】

「置換」とは、特定のアミノ酸残基が取り除かれ、かつ他のアミノ酸残基が同じ位置に挿入されていることをいう。

#### 【0014】

「欠失」とは、特定のアミノ酸残基が取り除かれていることを意味する。

#### 【0015】

「挿入」とは、特定のアミノ酸残基の前にあるいは後ろに、1個または複数個のアミノ酸残基が挿入されていることをいい、具体的には、特定のアミノ酸残基の $\alpha$ -カルボキシル基あるいは $\alpha$ -アミノ基に、1個または複数個、好ましくは、1個ないし数個、のアミノ酸残基が結合することをいう。

#### 【0016】

配列番号2に記載のアミノ酸配列およびその相同体に導入される特定変異の数は特に限定されないが、1個ないし数個、あるいは1または2個であることができる。

#### 【0017】

本発明の第一および第二の態様による変異体において、配列番号2に記載のアミノ酸配列およびその相同体に導入される変異は、好ましくは、置換である。

#### 【0018】

本発明の第一の態様による変異体において、配列番号2に記載のアミノ酸配列およびそ

の相同体の62番、122番、128番、165番、221番、395番、および550番のアミノ酸残基に導入される置換は、好ましくは、下記の通りである。

【0019】

62番のアミノ酸残基の、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群から選択される酸性アミノ酸、特にグルタミン酸、への置換。

【0020】

122番のアミノ酸残基の、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、およびバリンからなる群から選択されるアミノ酸、特にメチオニン、への置換。

【0021】

128番のアミノ酸残基の、アスパラギンおよびグルタミンからなる群から選択されるアミノ酸、特にアスパラギン、への置換。

【0022】

165番のアミノ酸残基の、トリプトファン、フェニルアラニン、およびチロシンからなる群から選択される芳香族アミノ酸、特にフェニルアラニン、への置換。

【0023】

221番のアミノ酸残基の、トリプトファン、フェニルアラニン、およびチロシンからなる群から選択される芳香族アミノ酸、特にチロシン、への置換。

【0024】

395番のアミノ酸残基の、ロイシン、メチオニン、イソロイシン、およびバリンからなる群から選択されるアミノ酸、特にロイシン、への置換。

【0025】

550番のアミノ酸残基の、セリンおよびスレオニンからなる群から選択されるヒドロキシアミノ酸、特にセリン、への置換。

【0026】

本発明の第一の態様による変異体においては、配列番号2に記載のアミノ酸配列およびその相同体の、170番、300番、313番、および386番の少なくとも1つのアミノ酸残基において、更に変異、好ましくは、置換、を有していてもよい。これらの変異を有するβ-フルクトフラノシダーゼは、1-ケストースを選択的にかつ効率的に生産できる点で有利である（例えば、WO 99/13059号公報参照）。

【0027】

本発明の第一の態様による変異体において、配列番号2に記載のアミノ酸配列およびその相同体の170番、300番、313番、および386番に導入することができる置換は、好ましくは、下記の通りである。

【0028】

170番のアミノ酸残基の、トリプトファン、フェニルアラニン、およびチロシンからなる群から選択される芳香族アミノ酸、特にトリプトファン、への置換。

【0029】

300番のアミノ酸残基の、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシンおよびバリンからなる群から選択されるアミノ酸への置換。

【0030】

313番のアミノ酸残基の、リジン、アルギニン、およびヒスチジンからなる群から選択される塩基性アミノ酸、特にリジンまたはアルギニン、への置換。

【0031】

386番のアミノ酸残基の、リジン、アルギニン、およびヒスチジンからなる群から選択される塩基性アミノ酸、特にリジン、への置換。

【0032】

本発明の第一の態様による変異体において、配列番号2に記載のアミノ酸配列およびその相同体に導入することができる好ましい多重変異としては、165番のアミノ酸残基と、300番のアミノ酸残基と、313番のアミノ酸残基の三重変異、より好ましくは三重置換、が挙げられ、特に好ましくは、165番のアミノ酸残基のフェニルアラニンへの置

換と、300番のアミノ酸残基のバリンへの置換と、および313番のアミノ酸残基のリジンへの置換とからなる三重置換が挙げられる。

#### 【0033】

本発明の第二の態様による変異体において、配列番号2に記載のアミノ酸配列およびその相同体の40番、379番、および381番のアミノ酸残基に導入される置換は、好ましくは、下記の通りである。

#### 【0034】

40番のアミノ酸残基の、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群から選択される酸性アミノ酸、特にアスパラギン酸、への置換。

#### 【0035】

379番のアミノ酸残基の、システインへの置換。

#### 【0036】

381番のアミノ酸残基の、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、およびバリンからなる群から選択されるアミノ酸、特にメチオニン、への置換。

#### 【0037】

本発明による第一および第二の態様による変異体において、「相同体」とは、1個または複数個の変異を有する配列番号2に記載のアミノ酸配列であって、 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ活性を有するもの、を意味する。変異の数は、1個ないし数個、あるいは1、2、3、または4個であることができる。

#### 【0038】

本発明において、相同体が $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ活性を有するか否かは、例えは、そのアミノ酸配列からなるタンパク質を基質に作用させ、反応産物を検出することにより評価することができ、例えは、実施例2に記載の方法に従って評価することができる。

#### 【0039】

相同体における本発明による特定変異の位置は、配列番号2のアミノ酸配列と当該相同体とを整列することにより、相同体に与えられた配列番号2のアミノ酸残基番号に対応する。例えは、相同体における「62番のアミノ酸残基の変異」とは、その相同体の62番目のアミノ酸残基の変異ではなく、配列番号2のアミノ酸配列の62番のアミノ酸残基に対応する相同体のアミノ酸残基の変異を意味する。

#### 【0040】

配列番号2のアミノ酸配列と当該相同体との整列は、配列同一性を調べるための分析用ソフトウエアを用いて行うことができる。このようなソフトウエアは周知であり、当業者であれば適宜選択して使用することは言うまでもない。例えは、BLAST法 (Basic local alignment search tool; Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol., 215, 403-410 (1990)) を使用して配列番号2のアミノ酸配列と当該相同体とを整列させて、対応するアミノ酸残基を決定することができる。

#### 【0041】

相同体の例としては、1個または複数個（例えは、1個ないし数個）の活性に影響を与えない変異を有する配列番号2に記載のアミノ酸配列が挙げられる。

#### 【0042】

ここで「活性に影響を与えない変異」の例としては、保存的置換が挙げられる。「保存的置換」とは、タンパク質の活性を実質的に改変しないように1若しくは複数個のアミノ酸残基を、別の化学的に類似したアミノ酸残基で置き換えることを意味する。例えは、ある疎水性残基を別の疎水性残基によって置換する場合、ある極性残基を同じ電荷を有する別の極性残基によって置換する場合などが挙げられる。このような置換を行うことができる機能的に類似のアミノ酸は、アミノ酸毎に当該技術分野において公知である。具体例を挙げると、非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、プロリン、トリプトファン、フェニルアラニン、メチオニン等が挙げられる。極性（中性）アミノ酸としては、グリシン、セリン、スレオニン、チロシン、グルタミン、アスパラギン、システイン等が挙げられる。陽電荷をもつ（塩基性）アミノ酸としては、ア

ルギニン、ヒスチジン、リジン等が挙げられる。また、負電荷をもつ（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸等が挙げられる。

#### 【0043】

「相同体」の例としては、*Aspergillus*属に属する微生物から生産される $\beta$ -フルクトフラノシダーゼが挙げられ、例えば、*Aspergillus niger*由来の $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ、*Scopulariopsis brevicaulis*由来の $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ、*Penicillium roquefortii*由来の $\beta$ -フルクトフラノシダーゼが挙げられる。*Scopulariopsis brevicaulis*由来の $\beta$ -フルクトフラノシダーゼとしてはWO 99/13059号公報の配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質（配列番号4）が挙げられる。また、*Penicillium roquefortii*由来の $\beta$ -フルクトフラノシダーゼとしてはWO 99/13059号公報の配列番号3のアミノ酸配列からなるタンパク質（配列番号6）が挙げられる。

#### 【0044】

本発明によれば、本発明による $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体をコードする遺伝子が提供される。

#### 【0045】

一般に、タンパク質のアミノ酸配列が与えられれば、それをコードするDNA配列は、いわゆるコドン表を参照して容易に定まる。従って、本発明による特定変異が導入された配列番号1のアミノ酸配列およびその相同体、例えば、本発明による特定変異が導入された配列番号1、3、および5のアミノ酸配列、をコードする種々のDNA配列を適宜選択することが可能である。よって、本発明による特定変異が導入された $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体をコードするDNA配列とは、本発明による特定アミノ酸変異に対応するDNA変異を有する $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ遺伝子のみならず、その縮重関係にあるコドンが使用されている以外は同一のDNA配列を有し、かつ $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体をコードするDNA配列をも意味する。例えば、本発明による特定変異が導入された配列番号1、3、および5のアミノ酸配列をコードするDNA配列とは、後述する表3に記載の1以上の変異を有する配列番号1、3、および5のDNA配列のみならず、その縮重関係にあるコドンが使用されている以外は同一のDNA配列を有し、かつ $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体をコードするDNA配列をも意味する。

#### 【0046】

##### $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体の作製

$\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体は、組換えDNA技術、ポリペプチド合成技術などによって作製することができる。組換えDNA技術を用いる場合には、 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼをコードするDNA（例えば、配列番号1、3、または5のDNA配列）を取得し、このDNAに部位特異的変異あるいはランダム変異を発生させてコードするアミノ酸を置換させた後、変異処理を施したDNAを含む発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、形質転換細胞を培養することによって $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体を調製することができる。

#### 【0047】

遺伝子の部位特異的変異を導入するための方法は、Gapped duplex法やKunkel法など当業者に周知の方法を用いることができる。これらの方法は、 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼをコードするDNAの特異的部位に突然変異を発生させることに利用することができる。

#### 【0048】

また、ランダム変異を導入するためには、エラーブローンPCR法など一般的に行われている方法が採用できる。変異処理後のDNAの塩基配列は、マキサム・ギルバートの化学修飾法やジデオキシヌクレオチド鎖終結法などにより確認することができ、 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体のアミノ酸配列は、確認された塩基配列より解読することができる。

#### 【0049】

##### $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体の生産

$\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体は、それをコードするDNA断片を、宿主細胞内で

複製可能でかつ同遺伝子が発現可能な状態で含むDNA分子、特にDNA発現ベクター、に連結してなる組換えベクターを調製し、その組換えベクターを宿主に導入して形質転換体を得、その形質転換体を適当な培養条件下で培養することにより、調製することができる。

#### 【0050】

本発明において利用されるベクターは、使用する宿主細胞の種類を勘案して、ウィルス、プラスミド、コスミドベクターなどから適宜選択することができる。例えば、宿主細胞が大腸菌の場合はpUC、pBR系のプラスミド、枯草菌の場合はpUB系のプラスミド、酵母の場合はYEp、YRp、YCP系のプラスミドベクターが挙げられる。

#### 【0051】

本発明の好ましい態様によれば、組換えベクターとしてプラスミドを使用することができる。プラスミドは形質転換体の選択マーカーを含むのが好ましく、選択マーカーとしては薬剤耐性マーカー、栄養要求マーカー遺伝子を使用することができる。その好ましい具体例としては、使用する宿主細胞が細菌の場合はアンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子などであり、酵母の場合はトリプトファン合成遺伝子（TRP1）、ウラシル合成遺伝子（URA3）、ロイシン合成遺伝子（LEU2）などがあり、カビの場合はハイグロマイシン耐性遺伝子（Hyg）、ビアラホス耐性遺伝子（Bar）、硝酸還元酵素遺伝子（niaD）などが挙げられる。

#### 【0052】

本発明による発現ベクターとしてのDNA分子は、変異遺伝子の発現に必要なDNA配列、例えばプロモーター、転写開始信号、リボゾーム結合部位、翻訳停止シグナル、転写終結シグナルなどの転写調節シグナル、翻訳調節シグナルなどを有しているのが好ましい。

#### 【0053】

プロモーターとしては、挿入断片に含まれる宿主中において機能することができるプロモーターはもちろんのこと、大腸菌においてはラクトースオペロン（lac）、トリプトファンオペロン（trp）等のプロモーター、酵母ではアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子（ADH）、酸性フォスファターゼ遺伝子（PHO）、ガラクトース遺伝子（GAL）、グリセロアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子（GPD）などのプロモーター、カビでは $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子（amy）、セロビオハイドロラーゼI遺伝子（CBHI）等のプロモーターを好ましく用いることができる。

#### 【0054】

宿主としては、宿主-ベクター系が確立されているものであればいずれも利用可能であり、好ましくは、カビ、酵母が挙げられる。宿主細胞の形質転換により得られた形質転換体は、適当な条件で培養し、得られた培養液から一般的な方法によって酵素の分取や精製を行うことにより $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体を得ることができる。また、宿主が枯草菌、酵母、カビの場合には、分泌型ベクターを使用して、菌体外に組換え $\beta$ -フルクトフラノシダーゼを分泌させることも有利である。

#### 【0055】

形質転換体から生産される本発明による変異体は、次のようにして得ることが出来る。まず前記の宿主細胞を適切な条件下で培養し、得られた培養物から公知の方法、例えば遠心分離により培養上清あるいは菌体を得る。菌体の場合にはこれを適切な緩衝液中に懸濁し、凍結融解、超音波処理、磨碎等により菌体を破碎し、遠心分離またはろ過により組換え新規酵素を含有する菌体抽出物を得る。

#### 【0056】

酵素の精製は、慣用されている分離、精製法を適宜組み合わせて実施することができる。例えば、熱処理のような耐熱性の差を利用する方法、塩沈殿および溶媒沈殿のような溶解性の差を利用する方法、透析、限外ろ過、ゲルろ過およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のような分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーのよう

な電荷の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーのような特異的親和性を利用する方法、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーのような疎水性の差を利用する方法、更に等電点電気泳動のような等電点の差を利用する方法等が挙げられる。

### 【0057】

#### フラクトオリゴ糖の製造

本発明によれば、本発明による形質転換体または本発明による $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体を用いた、フラクトオリゴ糖の製造法が提供される。すなわち、本発明によるフラクトオリゴ糖の製造法は、本発明による形質転換体または本発明による $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体と、スクロースとを接触させることによって実施される。

### 【0058】

本発明による形質転換体または本発明による $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体と、スクロースとの接触態様およびその条件は、変異体がスクロースに作用可能な様態である限り特に限定されない。溶液中で接触させる場合の好ましい態様を示せば次の通りである。すなわち、スクロースの使用濃度は、用いる糖が溶解されうる範囲であれば、本酵素の比活性、反応温度等を考慮して適宜選択してよいが、5～80%の範囲とするのが一般的であり、好ましくは30～70%の範囲である。糖と酵素との反応における反応温度およびpH条件は、変異体の最適条件下で行うことが好ましく、例えば、30～80°C程度、pH4～10程度の条件下で行うのが一般的であり、好ましくは40～70°C、pH5～7の範囲である。

### 【0059】

また、変異体の精製の程度も適宜選択することができ、形質転換体の培養上清あるいは菌体破碎物から粗酵素のまま用いることもでき、また、各種精製工程で得られた精製酵素として利用してもよい。さらには各種精製手段を経て単離精製された酵素として用いてもよい。

### 【0060】

更に酵素は、常法に準じて担体に固定化された状態でスクロースと接触させてもよい。

### 【0061】

生成したフラクトオリゴ糖は、反応液を公知の方法に従い精製することにより得ることが出来る。例えば、加熱して酵素を失活させた後、活性炭により脱色し、さらに、イオン交換樹脂で脱塩する方法が挙げられる。

### 【0062】

本発明の第一の態様の変異体をフラクトオリゴ糖の調製に用いると、1-ケストース生成量が増大し、ニストース生成量が抑制される。従って、本発明によれば1-ケストースの選択的な製造法が提供される。すなわち本発明によれば、第一の態様の $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体あるいは第一の態様の $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体をコードするポリヌクレオチドを発現可能な形質転換体と、スクロースを接触させる工程を含んでなる、1-ケストースの製造法が提供される。

### 【0063】

本発明の第二の態様の変異体をフラクトオリゴ糖の調製に用いると、ニストースの生成量が増大し、1-ケストース生成量が抑制される。従って、本発明によればニストースの選択的な製造法が提供される。すなわち本発明によれば、第二の態様の $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体あるいは第二の態様の $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体をコードするポリヌクレオチドを発現可能な形質転換体と、スクロースを接触させる工程を含んでなる、ニストースの製造法が提供される。

### 【実施例】

### 【0064】

本発明を下記例により詳細に説明するが、本発明がこれらの例に限定されることは言うまでもない。

### 【0065】

実施例1： $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体の作製

$\beta$ -フルクトフラノシダーゼ遺伝子へのランダム変異の導入は、市販のPCR mutagenesis kit (Gene Morph, Stratagene社)を用いて以下のように行った。鑄型DNAとして、ATCC 20611株 (*A. niger*) 由来の $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ遺伝子を用いた。具体的には、WO 97/34004に記載のプラスミド pAW20-Hygを使用した。PCR反応液は、鑄型DNA 1  $\mu$ l、40 mM dNTP 1  $\mu$ l、10倍濃度の緩衝液 5  $\mu$ l、プライマーとして 5'-GCGAATTCACTGAAGCTCACCACTACCA-3' (N末端) (配列番号7) および 5'-GCGGATCCGGTCAAATTCTCT-3' (C末端) (配列番号8) 250 ng/ml を各 0.5  $\mu$ l、Mutazyme 1  $\mu$ l、DMSO 5  $\mu$ l、滅菌水 36  $\mu$ l を加えて 50  $\mu$ l とした。反応は 94°C、2 分間の前処理後、94°C、1 分間 (変性ステップ)、50°C、2 分間 (アニーリングステップ)、72°C、2.5 分間 (伸長ステップ) のインキュベーションを 30 サイクル行った。最後に 72°C、3 分間のインキュベーションを行い反応を終了させた。反応液をフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコールで抽出し、その後エタノール沈殿を行った。沈殿を TE 緩衝液に溶解後、アガロース電気泳動を行い、特異的に増幅された 1.9 kbp のバンドを常法に従って切り出して DNA 断片を回収した。WO 97/34004 に記載の方法で、1.9 kbp の EcoRI-BamHI 断片を pY2831 の EcoRI-BamHI 部位に挿入したプラスミドを *S. cerevisiae* MS-161 株に酢酸リチウム法で導入し、形質転換体を得た。得られた形質転換体を SD-GF 培地 (0.67% yeast nitrogen base w/o amino acids, 2% スクロース、2% casamino acids, 50  $\mu$ g/ml ウラシル) で 30°C、3 日間培養し、 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体を得た。

#### 【0066】

#### 実施例2： $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体の反応特性の評価

実施例1で作製した $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体を用いてスクロースを基質とした酵素反応を基質濃度 4.8%、pH 7、40°C の反応条件で行い、反応液の糖組成を HPLC 分析した。野生型 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼの酵素反応液の糖組成と比較して、糖組成が変動したものを反応特性が改変された $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体とした。

#### 【0067】

反応特性が改変された $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体の変異点を同定するために、DNA 塩基配列を解析した。ファルマシア社の DNA シークエンスキットを用い、シークエンス反応を行った。反応後のサンプルは、ファルマシア社の DNA シークエンサー (ALF red) を用いて解析を行い、各 DNA 断片の塩基配列を得た。その後、DNA 解析ソフト (DNASIS、日立ソフトウェアエンジニアリング社) にて最終的な塩基配列を得て、ランダム変異の導入された変異点を決定した。その結果、表1 および表2 に示したように、1-kestostose 生成量が増大し、nistose 生成量が抑制される $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体、および nistose 生成量が増大した $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体が得られていることが明らかとなった。

【表 1】

表 1 : 1-ケストース生成量が増大し、ニストース生成量が

抑制された  $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体

|           | F   | G    | G F  | G F <sub>2</sub> | G F <sub>3</sub> | G F <sub>4</sub> |
|-----------|-----|------|------|------------------|------------------|------------------|
| 野生型       | 0.4 | 22.3 | 20.5 | 45.1             | 11.3             | 0.3              |
| G 6 2 E   | 0.6 | 22.1 | 21.1 | 46.0             | 10.0             | 0.2              |
| L 1 2 2 M | 0.7 | 22.1 | 19.7 | 47.9             | 9.6              | 0.0              |
| I 1 2 8 N | 0.8 | 20.7 | 26.5 | 45.1             | 6.5              | 0.5              |
| V 1 6 5 F | 0.6 | 22.0 | 19.8 | 46.8             | 10.8             | 0.0              |
| H 2 2 1 Y | 0.6 | 23.8 | 20.1 | 45.8             | 9.5              | 0.2              |
| Q 3 9 5 L | 0.6 | 22.1 | 21.4 | 46.5             | 9.1              | 0.2              |
| T 5 5 0 S | 0.9 | 26.3 | 13.1 | 48.4             | 10.4             | 0.9              |

F : フルクトース

G : グルコース

G F : スクロース

G F 2 : 1-ケストース

G F 3 : ニストース

G F 4 : 1-フルクトシルニストース

【表2】

表2：ニストースの生成量が増大し、1-ケストース生成量が  
抑制された  $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体

|           | F   | G    | G F  | G F <sub>2</sub> | G F <sub>3</sub> | G F <sub>4</sub> |
|-----------|-----|------|------|------------------|------------------|------------------|
| 野生型       | 0.4 | 22.3 | 20.5 | 45.1             | 11.3             | 0.3              |
| G 4 0 D   | 0.6 | 22.3 | 20.3 | 41.6             | 14.7             | 0.5              |
| T 3 8 1 M | 1.5 | 23.7 | 23.9 | 28.8             | 19.3             | 2.8              |
| W 3 7 9 C | 1.1 | 22.6 | 22.5 | 36.2             | 17.0             | 0.6              |

F : フルクトース

G : グルコース

G F : スクロース

G F 2 : 1-ケストース

G F 3 : ニストース

G F 4 : 1-フルクトシルニストース

【0068】

得られた変異とそれに対応するDNA配列は下記の通りであった。下線は変異したDNAを示す。

## 【表3】

表3：変異部分のアミノ酸残基とDNA配列

|           |       |                     |       |          |
|-----------|-------|---------------------|-------|----------|
| G 6 2 E   | G A C | <u>G A</u> G        | G A C |          |
|           | A s p | G l u               | A s p | (配列番号9)  |
| L 1 2 2 M | T T C | <u>A</u> T G        | C C C |          |
|           | P h e | M e t               | P r o | (配列番号10) |
| I 1 2 8 N | T C C | A <u>A</u> C        | C C C |          |
|           | S e r | A s n               | P r o | (配列番号11) |
| V 1 6 5 F | G C C | <u>T</u> T C        | G A C |          |
|           | A l a | P h e               | A s p | (配列番号12) |
| H 2 2 1 Y | G T G | <u>T</u> A C        | G G C |          |
|           | V a l | T y r               | G l y | (配列番号13) |
| Q 3 9 5 L | G C C | C <u>T</u> G        | C A G |          |
|           | A l a | L e u               | G l n | (配列番号14) |
| T 5 5 0 S | T T T | <u>T</u> C <u>G</u> | G A G |          |
|           | P h e | S e r               | G l u | (配列番号15) |
| G 4 0 D   | A T C | G <u>A</u> C        | G A C |          |
|           | I l e | A s p               | A s p | (配列番号16) |
| T 3 8 1 M | T T G | A <u>T</u> G        | G G C |          |
|           | L e u | M e t               | G l y | (配列番号17) |
| W 3 7 9 C | G T C | T G <u>C</u>        | T T G |          |
|           | V a l | C y s               | L e u | (配列番号18) |

## 【0069】

## 実施例3：部位指定変異による多重置換体の調製と反応特性の評価

実施例2で得られたV165FとWO97/34004に記載のG300VとH313Kを組み合わせた3重置換変異体を部位特異的変異導入により調製した。具体的には、実施例1および2で調製したV165Fの変異が導入された $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ遺伝子をpUC118(宝酒造)のEcoRI-BamHI部位に挿入したプラスミドを調製した。次いで、WO97/34004号公報の実施例D8と同様の方法でG300VとH313Kの変異を順次導入した。実施例2と同じ方法でDNA塩基配列を調べた結果、目的の部分の塩基配列のみが置換されていることを確認した。

【0070】

3重置換体V165F+G300V+H313Kの反応特性を実施例2の方法に従って調べた結果は表3に記載される通りであった。野生型 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼと比較すると、1-ケストースの糖組成%は約10%増大し、ニストースの生成量は7%減少した。

【表4】

表4：三重置換体の反応特性

|                   | F   | G    | GF   | GF <sub>2</sub> | GF <sub>3</sub> | GF <sub>4</sub> |
|-------------------|-----|------|------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 野生型               | 0.4 | 22.3 | 20.5 | 45.1            | 11.3            | 0.3             |
| V165F/G300V/H313K | 1.7 | 22.5 | 15.8 | 55.7            | 4.3             | 0.0             |

F：フルクトース

G：グルコース

GF：スクロース

GF<sub>2</sub>：1-ケストース

GF<sub>3</sub>：ニストース

GF<sub>4</sub>：1-フルクトシルニストース

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Meiji Seika Kaisya Ltd.

<120> Mutated  $\beta$ -fructofuranosidase

&lt;130&gt; 146856

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 18

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1905

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Aspergillus niger

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1905)

&lt;400&gt; 1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| tca | ta  | cac | ctg | gac | acc | acg | gcc | ccg | ccg | ccg | acc | aac | ctc | agc | acc | 48  |
| Ser | Tyr | His | Leu | Asp | Thr | Thr | Ala | Pro | Pro | Pro | Pro | Thr | Asn | Leu | Ser | Thr |
| 1   |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| ctc | ccc | aac | aac | acc | ctc | ttc | cac | gtg | tgg | cgg | ccg | cgc | gcg | cac | atc | 96 |
| Leu | Pro | Asn | Asn | Thr | Leu | Phe | His | Val | Trp | Arg | Pro | Arg | Ala | His | Ile |    |
|     |     |     |     | 20  |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |    |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ctg | ccc | gcc | gag | ggc | cag | atc | ggc | gac | ccc | tgc | gcg | cac | tac | acc | gac | 144 |
| Leu | Pro | Ala | Glu | Gly | Gln | Ile | Gly | Asp | Pro | Cys | Ala | His | Tyr | Thr | Asp |     |
|     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| cca | tcc | acc | ggc | ctc | ttc | cac | gtg | ggg | ttc | ctg | cac | gac | ggg | gac | ggc | 192 |
| Pro | Ser | Thr | Gly | Leu | Phe | His | Val | Gly | Phe | Leu | His | Asp | Gly | Asp | Gly |     |
|     | 50  |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| atc | gcg | ggc | gcc | acc | acg | gcc | aac | ctg | gcc | acc | tac | acc | gat | acc | tcc | 240 |
| Ile | Ala | Gly | Ala | Thr | Thr | Ala | Asn | Leu | Ala | Thr | Tyr | Thr | Asp | Thr | Ser |     |
| 65  |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| gat | aac | ggg | agc | ttc | ctg | atc | cag | ccg | ggc | ggg | aag | aac | gac | ccc | gtc | 288 |
| Asp | Asn | Gly | Ser | Phe | Leu | Ile | Gln | Pro | Gly | Gly | Lys | Asn | Asp | Pro | Val |     |
|     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| gcc | gtg | ttc | gac | ggc | gcc | gtc | atc | ccc | gtc | ggc | gtc | aac | aac | acc | ccc | 336 |  |
| Ala | Val | Phe | Asp | Gly | Ala | Val | Ile | Pro | Val | Gly | Val | Asn | Asn | Thr | Pro |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     |     |     | 110 |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     |     |     |  |
| acc | tta | ctc | tac | acc | tcc | gtc | tcc | ttc | ctg | ccc | atc | cac | tgg | tcc | atc | 384 |  |
| Thr | Leu | Leu | Tyr | Thr | Ser | Val | Ser | Phe | Leu | Pro | Ile | His | Trp | Ser | Ile |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     |     | 125 |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     |     |  |
| ccc | tac | acc | cgc | ggc | agc | gag | acg | cag | tcg | ttg | gcc | gtc | gcg | cgc | gac | 432 |  |
| Pro | Tyr | Thr | Arg | Gly | Ser | Glu | Thr | Gln | Ser | Leu | Ala | Val | Ala | Arg | Asp |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     |     | 140 |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     |     |     |  |
| ggc | ggc | cgc | cgc | ttc | gac | aag | ctc | gac | cag | ggc | ccc | gtc | atc | gcc | gac | 480 |  |
| Gly | Gly | Arg | Arg | Phe | Asp | Lys | Leu | Asp | Gln | Gly | Pro | Val | Ile | Ala | Asp |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     | 145 |     |     |     |     |     | 160 |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     |     |     |  |
| cac | ccc | ttc | gcc | gtc | gac | gtc | acc | gcc | ttc | cgc | gat | ccg | ttt | gtc | ttc | 528 |  |
| His | Pro | Phe | Ala | Val | Asp | Val | Thr | Ala | Phe | Arg | Asp | Pro | Phe | Val | Phe |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     | 165 |     |     |     |     |     | 175 |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     |     |  |
| cgc | agt | gcc | aag | ttg | gat | gtg | ctg | ctg | tcg | ttg | gat | gag | gag | gtg | gcg | 576 |  |
| Arg | Ser | Ala | Lys | Leu | Asp | Val | Leu | Leu | Ser | Leu | Asp | Glu | Glu | Val | Ala |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     | 180 |     |     |     |     |     | 190 |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     |     |  |
| cgg | aat | gag | acg | gcc | gtg | cag | cag | gcc | gtc | gat | ggc | tgg | acc | gag | aag | 624 |  |
| Arg | Asn | Glu | Thr | Ala | Val | Gln | Gln | Ala | Val | Asp | Gly | Trp | Thr | Glu | Lys |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     | 195 |     |     |     |     |     | 205 |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     |     |     |  |
| aac | gcc | ccc | tgg | tat | gtc | gcg | gtc | tct | ggc | ggg | gtg | cac | ggc | gtc | ggg | 672 |  |
| Asn | Ala | Pro | Trp | Tyr | Val | Ala | Val | Ser | Gly | Gly | Val | His | Gly | Val | Gly |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     | 210 |     |     |     |     |     | 220 |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     |     |     |  |
| ccc | gcg | cag | ttc | ctc | tac | cgc | cag | aac | ggc | ggg | aac | gct | tcc | gag | ttc | 720 |  |
| Pro | Ala | Gln | Phe | Leu | Tyr | Arg | Gln | Asn | Gly | Gly | Asn | Ala | Ser | Glu | Phe |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     | 225 |     |     |     |     |     | 240 |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     |     |     |  |
| cag | tac | tgg | gag | tac | ctc | ggg | gag | tgg | tgg | cag | gag | gcg | acc | aac | tcc | 768 |  |
| Gln | Tyr | Trp | Glu | Tyr | Leu | Gly | Glu | Trp | Trp | Gln | Glu | Ala | Thr | Asn | Ser |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     | 245 |     |     |     |     |     | 255 |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     |     |     |  |
| agc | tgg | ggc | gac | gag | ggc | acc | tgg | gcc | ggg | cgc | tgg | ggg | ttc | aac | ttc | 816 |  |
| Ser | Trp | Gly | Asp | Glu | Gly | Thr | Trp | Ala | Gly | Arg | Trp | Gly | Phe | Asn | Phe |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     | 260 |     |     |     |     |     | 270 |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     |     |     |  |
| gag | acg | ggg | aat | gtg | ctc | ttc | ctc | acc | gag | gag | ggc | cat | gac | ccc | cag | 864 |  |
| Glu | Thr | Gly | Asn | Val | Leu | Phe | Leu | Thr | Glu | Glu | Gly | His | Asp | Pro | Gln |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     | 275 |     |     |     |     |     | 285 |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     |     |     |  |
| acg | ggc | gag | gtg | ttc | gtc | acc | ctc | ggc | acg | gag | ggg | tct | ggc | ctg | cca | 912 |  |
| Thr | Gly | Glu | Val | Phe | Val | Thr | Leu | Gly | Thr | Glu | Gly | Ser | Gly | Leu | Pro |     |  |

290

295

300

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| atc | gtg | ccg | cag | gtc | tcc | agt | atc | cac | gat | atg | ctg | tgg | gcg | gcg | ggt | 960  |
| Ile | Val | Pro | Gln | Val | Ser | Ser | Ile | His | Asp | Met | Leu | Trp | Ala | Ala | Gly |      |
| 305 |     |     |     | 310 |     |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |      |
| gag | gtc | ggg | gtg | ggc | agt | gag | cag | gag | ggt | gcc | aag | gtc | gag | tcc | tcc | 1008 |
| Glu | Val | Gly | Val | Gly | Ser | Glu | Gln | Glu | Gly | Ala | Lys | Val | Glu | Phe | Ser |      |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     | 330 |     |     |     |     |     |     | 335 |      |
| ccc | tcc | atg | gcc | ggg | ttt | ctg | gac | tgg | ggg | tcc | agc | gcc | tac | gct | gcg | 1056 |
| Pro | Ser | Met | Ala | Gly | Phe | Leu | Asp | Trp | Gly | Phe | Ser | Ala | Tyr | Ala | Ala |      |
|     |     |     |     | 340 |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |     |      |
| gcg | ggc | aag | gtg | ctg | ccg | gcc | agc | tcg | gcg | gtg | tcg | aag | acc | agc | ggc | 1104 |
| Ala | Gly | Lys | Val | Leu | Pro | Ala | Ser | Ser | Ala | Val | Ser | Lys | Thr | Ser | Gly |      |
|     |     |     |     | 355 |     |     | 360 |     |     |     | 365 |     |     |     |     |      |
| gtg | gag | gtg | gat | cgg | tat | gtc | tcg | tcc | gtc | tgg | ttg | acg | ggc | gac | cag | 1152 |
| Val | Glu | Val | Asp | Arg | Tyr | Val | Ser | Phe | Val | Trp | Leu | Thr | Gly | Asp | Gln |      |
|     |     |     |     | 370 |     |     | 375 |     |     |     | 380 |     |     |     |     |      |
| tac | gag | cag | gcg | gac | ggg | tcc | ccc | acg | gcc | cag | cag | ggg | tgg | acg | ggg | 1200 |
| Tyr | Glu | Gln | Ala | Asp | Gly | Phe | Pro | Thr | Ala | Gln | Gln | Gly | Trp | Thr | Gly |      |
|     |     |     |     | 385 |     |     | 390 |     |     | 395 |     |     | 400 |     |     |      |
| tcg | ctg | ctg | ctg | ccg | cgc | gag | ctg | aag | gtg | cag | acg | gtg | gag | aac | gtc | 1248 |
| Ser | Leu | Leu | Leu | Pro | Arg | Glu | Leu | Lys | Val | Gln | Thr | Val | Glu | Asn | Val |      |
|     |     |     |     | 405 |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |     |     |      |
| gtc | gac | aac | gag | ctg | gtg | cgc | gag | gag | ggc | gtg | tcg | tgg | gtg | gtg | ggg | 1296 |
| Val | Asp | Asn | Glu | Leu | Val | Arg | Glu | Glu | Gly | Val | Ser | Trp | Val | Val | Gly |      |
|     |     |     |     | 420 |     |     | 425 |     |     |     | 430 |     |     |     |     |      |
| gag | tcg | gac | aac | cag | acg | gcc | agg | ctg | cgc | acg | ctg | ggg | atc | acg | atc | 1344 |
| Glu | Ser | Asp | Asn | Gln | Thr | Ala | Arg | Leu | Arg | Thr | Leu | Gly | Ile | Thr | Ile |      |
|     |     |     |     | 435 |     |     | 440 |     |     |     | 445 |     |     |     |     |      |
| gcc | cgg | gag | acc | aag | gcg | gcc | ctg | ctg | gcc | aac | ggc | tcg | gtg | acc | gcg | 1392 |
| Ala | Arg | Glu | Thr | Lys | Ala | Ala | Leu | Leu | Ala | Asn | Gly | Ser | Val | Thr | Ala |      |
|     |     |     |     | 450 |     |     | 455 |     |     |     | 460 |     |     |     |     |      |
| gag | gag | gac | cgc | acg | ctg | cag | acg | gcg | gcc | gtc | gtg | ccg | tcc | gcg | caa | 1440 |
| Glu | Glu | Asp | Arg | Thr | Leu | Gln | Thr | Ala | Ala | Val | Val | Pro | Phe | Ala | Gln |      |
|     |     |     |     | 465 |     |     | 470 |     |     | 475 |     |     | 480 |     |     |      |
| tcg | ccg | agc | tcc | aag | ttc | ttc | gtg | ctg | acg | gcc | cag | ctg | gag | tcc | ccc | 1488 |
| Ser | Pro | Ser | Ser | Lys | Phe | Phe | Val | Leu | Thr | Ala | Gln | Leu | Glu | Phe | Pro |      |
|     |     |     |     | 485 |     |     | 490 |     |     |     | 495 |     |     |     |     |      |

|   |       |       |       |         |
|---|-------|-------|-------|---------|
| g c g   a g c   g c g   c g c   t c g   t c c   c c g   c t c   c a g   t c c   g g g   t t c   g a a   a t c   c t g   g c g | 5 0 0 | 5 0 5 | 5 1 0 | 1 5 3 6 |
| Ala   Ser   Ala   Arg   Ser   Ser   Pro   Leu   Gln   Ser   Gly   Phe   Glu   Ile   Leu   Ala                                 |       |       |       |         |
| t c g   g a g   c t g   g a g   c g c   a c g   g c c   a t c   t a c   t a c   c a g   t t c   a g c   a a c   g a g   t c g | 5 1 5 | 5 2 0 | 5 2 5 | 1 5 8 4 |
| Ser   Glu   Leu   Glu   Arg   Thr   Ala   Ile   Tyr   Tyr   Gln   Phe   Ser   Asn   Glu   Ser                                 |       |       |       |         |
| c t g   g t c   g t c   g a c   c g c   a g c   c a g   a c t   a g t   g c g   g c g   g c g   c c c   a c g   a a c   c c c | 5 3 0 | 5 3 5 | 5 4 0 | 1 6 3 2 |
| Leu   Val   Val   A s p   A r g   S e r   G l n   T h r   S e r   A l a   A l a   A l a   P r o   T h r   A s n   P r o       |       |       |       |         |
| g g g   c t g   g a t   a g c   t t t   a c t   g a g   t c c   g g c   a a g   t t g   c g g   t t g   t t c   g a c   g t g | 5 4 5 | 5 5 0 | 5 5 5 | 1 6 8 0 |
| G l y   L e u   A s p   S e r   P h e   T h r   G l u   S e r   G l y   L y s   L e u   A r g   L e u   P h e   A s p   V a l |       |       |       |         |
| a t c   g a g   a a c   g g c   c a g   g a g   c a g   g t c   g a g   a c g   t t g   g a t   c t c   a c t   g t c   g t c | 5 6 5 | 5 7 0 | 5 7 5 | 1 7 2 8 |
| I l e   G l u   A s n   G l y   G l n   G l u   G l n   V a l   G l u   T h r   L e u   A s p   L e u   T h r   V a l   V a l |       |       |       |         |
| g t g   g a t   a a c   g c g   g t t   g t c   g a g   g t g   t a t   g c c   a a c   g g g   c g c   t t t   g c g   t t g | 5 8 0 | 5 8 5 | 5 9 0 | 1 7 7 6 |
| V a l   A s p   A s n   A l a   V a l   V a l   G l u   V a l   T y r   A l a   A s n   G l y   A r g   P h e   A l a   L e u |       |       |       |         |
| a g c   a c c   t g g   g c g   a g a   t c g   t g g   t a c   g a c   a a c   t c c   a c c   c a g   a t c   c g c   t t c | 5 9 5 | 6 0 0 | 6 0 5 | 1 8 2 4 |
| S e r   T h r   T r p   A l a   A r g   S e r   T r p   T y r   A s p   A s n   S e r   T h r   G l n   I l e   A r g   P h e |       |       |       |         |
| t t c   c a c   a a c   g g c   g a g   g g c   g a g   g t g   c a g   t t c   a g g   a a t   g t c   t c c   g t g   t c g | 6 1 0 | 6 1 5 | 6 2 0 | 1 8 7 2 |
| P h e   H i s   A s n   G l y   G l u   G l y   G l u   V a l   G l n   P h e   A r g   A s n   V a l   S e r   V a l   S e r |       |       |       |         |
| g a g   g g g   c t c   t a t   a a c   g c c   t g g   c c g   g a g   a g a   a a t   | 6 2 5 | 6 3 0 | 6 3 5 | 1 9 0 5 |
| G l u   G l y   L e u   T y r   A s n   A l a   T r p   P r o   G l u   A r g   A s n   |       |       |       |         |

<210> 2  
<211> 635  
<212> PRT  
<213> Aspergillus niger

|   |    |    |    |    |
|---|----|----|----|----|
| <400> 2   |    |    |    |    |
| S e r   T y r   H i s   L e u   A s p   T h r   T h r   A l a   P r o   P r o   P r o   T h r   A s n   L e u   S e r   T h r | 1  | 5  | 10 | 15 |
| L e u   P r o   A s n   A s n   T h r   L e u   P h e   H i s   V a l   T r p   A r g   P r o   A r g   A l a   H i s   I l e | 20 | 25 | 30 |    |
| L e u   P r o   A l a   G l u   G l y   G l n   I l e   G l y   A s p   P r o   C y s   A l a   H i s   T y r   T h r   A s p |    |    |    |    |

35

40

45

Pro Ser Thr Gly Leu Phe His Val Gly Phe Leu His Asp Gly Asp Gly  
50 55 60

Ile Ala Gly Ala Thr Thr Ala Asn Leu Ala Thr Tyr Thr Asp Thr Ser  
65 70 75 80

Asp Asn Gly Ser Phe Leu Ile Gln Pro Gly Gly Lys Asn Asp Pro Val  
85 90 95

Ala Val Phe Asp Gly Ala Val Ile Pro Val Gly Val Asn Asn Thr Pro  
100 105 110

Thr Leu Leu Tyr Thr Ser Val Ser Phe Leu Pro Ile His Trp Ser Ile  
115 120 125

Pro Tyr Thr Arg Gly Ser Glu Thr Gln Ser Leu Ala Val Ala Arg Asp  
130 135 140

Gly Gly Arg Arg Phe Asp Lys Leu Asp Gln Gly Pro Val Ile Ala Asp  
145 150 155 160

His Pro Phe Ala Val Asp Val Thr Ala Phe Arg Asp Pro Phe Val Phe  
165 170 175

Arg Ser Ala Lys Leu Asp Val Leu Leu Ser Leu Asp Glu Glu Val Ala  
180 185 190

Arg Asn Glu Thr Ala Val Gln Gln Ala Val Asp Gly Trp Thr Glu Lys  
195 200 205

Asn Ala Pro Trp Tyr Val Ala Val Ser Gly Gly Val His Gly Val Gly  
210 215 220

Pro Ala Gln Phe Leu Tyr Arg Gln Asn Gly Gly Asn Ala Ser Glu Phe  
225 230 235 240

Gln Tyr Trp Glu Tyr Leu Gly Glu Trp Trp Gln Glu Ala Thr Asn Ser  
245 250 255

Ser Trp Gly Asp Glu Gly Thr Trp Ala Gly Arg Trp Gly Phe Asn Phe  
260 265 270

Glu Thr Gly Asn Val Leu Phe Leu Thr Glu Glu Gly His Asp Pro Gln  
275 280 285

Thr Gly Glu Val Phe Val Thr Leu Gly Thr Glu Gly Ser Gly Leu Pro  
290 295 300

Ile Val Pro Gln Val Ser Ser Ile His Asp Met Leu Trp Ala Ala Gly  
305 310 315 320

Glu Val Gly Val Gly Ser Glu Gln Glu Gly Ala Lys Val Glu Phe Ser  
325 330 335

Pro Ser Met Ala Gly Phe Leu Asp Trp Gly Phe Ser Ala Tyr Ala Ala  
340 345 350

Ala Gly Lys Val Leu Pro Ala Ser Ser Ala Val Ser Lys Thr Ser Gly  
355 360 365

Val Glu Val Asp Arg Tyr Val Ser Phe Val Trp Leu Thr Gly Asp Gln  
370 375 380

Tyr Glu Gln Ala Asp Gly Phe Pro Thr Ala Gln Gln Gly Trp Thr Gly  
385 390 395 400

Ser Leu Leu Leu Pro Arg Glu Leu Lys Val Gln Thr Val Glu Asn Val  
405 410 415

Val Asp Asn Glu Leu Val Arg Glu Glu Gly Val Ser Trp Val Val Gly  
420 425 430

Glu Ser Asp Asn Gln Thr Ala Arg Leu Arg Thr Leu Gly Ile Thr Ile  
435 440 445

Ala Arg Glu Thr Lys Ala Ala Leu Leu Ala Asn Gly Ser Val Thr Ala  
450 455 460

Glu Glu Asp Arg Thr Leu Gln Thr Ala Ala Val Val Pro Phe Ala Gln  
465 470 475 480

Ser Pro Ser Ser Lys Phe Phe Val Leu Thr Ala Gln Leu Glu Phe Pro  
485 490 495

Ala Ser Ala Arg Ser Ser Pro Leu Gln Ser Gly Phe Glu Ile Leu Ala  
500 505 510

Ser Glu Leu Glu Arg Thr Ala Ile Tyr Tyr Gln Phe Ser Asn Glu Ser  
515 520 525

Leu Val Val Asp Arg Ser Gln Thr Ser Ala Ala Ala Pro Thr Asn Pro  
530 535 540

Gly Leu Asp Ser Phe Thr Glu Ser Gly Lys Leu Arg Leu Phe Asp Val  
545 550 555 560

Ile Glu Asn Gly Gln Glu Gln Val Glu Thr Leu Asp Leu Thr Val Val  
565 570 575

Val Asp Asn Ala Val Val Glu Val Tyr Ala Asn Gly Arg Phe Ala Leu  
580 585 590

Ser Thr Trp Ala Arg Ser Trp Tyr Asp Asn Ser Thr Gln Ile Arg Phe  
595 600 605

Phe His Asn Gly Glu Gly Glu Val Gln Phe Arg Asn Val Ser Val Ser  
610 615 620

Glu Gly Leu Tyr Asn Ala Trp Pro Glu Arg Asn  
625 630 635

<210> 3

<211> 1809

<212> DNA

<213> Penicillium roqueforti

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1809)

<400> 3

gtt gat ttc cat acc ccg att gac tat aac tcg gct ccg cca aac ctt 48  
Val Asp Phe His Thr Pro Ile Asp Tyr Asn Ser Ala Pro Pro Asn Leu  
1 5 10 15

tct acc ctg gca aac gca tct ctt ttc aag aca tgg aga ccc aga gcc 96  
Ser Thr Leu Ala Asn Ala Ser Leu Phe Lys Thr Trp Arg Pro Arg Ala  
20 25 30

cat ctt ctc cct cca tct ggg aac ata ggc gac ccg tgc ggg cac tat 144  
His Leu Leu Pro Pro Ser Gly Asn Ile Gly Asp Pro Cys Gly His Tyr  
35 40 45

acc gat ccc aag act ggt ctc ttc cac gtg ggt tgg ctt tac agt ggg 192  
Thr Asp Pro Lys Thr Gly Leu Phe His Val Gly Trp Leu Tyr Ser Gly  
50 55 60

att tcg gga gcg aca acc gac gat ctc gtt acc tat aaa gac ctc aat 240  
Ile Ser Gly Ala Thr Thr Asp Asp Leu Val Thr Tyr Lys Asp Leu Asn  
65 70 75 80

ccc gat gga gcc ccg tca att gtt gca gga gga aag aac gac cct ctt 288  
Pro Asp Gly Ala Pro Ser Ile Val Ala Gly Gly Lys Asn Asp Pro Leu  
85 90 95

tct gtc ttc gat ggc tcg gtc att cca agc ggt ata gac ggc atg cca 336  
Ser Val Phe Asp Gly Ser Val Ile Pro Ser Gly Ile Asp Gly Met Pro

100

105

110

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| act | ctt | ctg | tat | acc | tct | gta | tca | ta  | c   | ctc | cca | atc | ca  | c   | tgg | tcc | atc | 384 |
| Thr | Leu | Leu | Tyr | Thr | Ser | Val | Ser | Tyr | Leu | Pro | Ile | His | Trp | Ser | Ile |     |     |     |
|     | 115 |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     | 125 |     |     |     |     |     |     |     |
| ccc | ta  | ac  | cc  | cgg | gga | agc | gag | aca | caa | tcc | ttg | gcc | gtt | tcc | ta  | t   | gac | 432 |
| Pro | Tyr | Thr | Arg | Gly | Ser | Glu | Thr | Gln | Ser | Leu | Ala | Val | Ser | Tyr | Asp |     |     |     |
|     | 130 |     |     |     | 135 |     |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |     |     |
| ggt | ggt | ca  | ac  | ttc | ac  | aag | ctc | aa  | caa | ggg | ccc | gtg | atc | cct | ac  | g   | 480 |     |
| Gly | Gly | His | Asn | Phe | Thr | Lys | Leu | Asn | Gln | Gly | Pro | Val | Val | Ile | Pro | Thr |     |     |
|     | 145 |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |     |     |
| cct | ccg | ttt | gct | ctc | aa  | gtc | ac  | cc  | gt  | ttc | cgt | gac | ccc | ta  | gtt | ttc | 528 |     |
| Pro | Pro | Phe | Ala | Leu | Asn | Val | Thr | Ala | Phe | Arg | Asp | Pro | Tyr | Val | Phe |     |     |     |
|     | 165 |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     | 175 |     |     |     |     |     |     |     |
| caa | agc | cca | att | ctg | gac | aaa | tct | gtc | aa  | gt  | acc | caa | gga | aca | tgg |     | 576 |     |
| Gln | Ser | Pro | Ile | Leu | Asp | Lys | Ser | Val | Asn | Ser | Thr | Gln | Gly | Thr | Trp |     |     |     |
|     | 180 |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     | 190 |     |     |     |     |     |     |     |
| tat | gtc | gc  | cc  | ata | tct | ggc | gg  | gtc | ca  | gg  | gt  | gtc | gg  | cct | tgt | cag | ttc | 624 |
| Tyr | Val | Ala | Ile | Ser | Gly | Gly | Val | His | Gly | Val | Gly | Pro | Cys | Gln | Phe |     |     |     |
|     | 195 |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |     |     |     |     |     |
| ctc | ta  | cgt | cag | aa  | gac | gca | ga  | tt  | ca  | ta  | t   | gg  | ga  | ta  | ctc | gg  | 672 |     |
| Leu | Tyr | Arg | Gln | Asn | Asp | Ala | Asp | Phe | Gln | Tyr | Trp | Glu | Tyr | Leu | Gly |     |     |     |
|     | 210 |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |     |     |     |     |
| caa | tgg | tgg | aag | gag | ccc | ctt | aa  | ac  | act | tgg | gga | aag | gg  | gt  | ga  | tgg | 720 |     |
| Gln | Trp | Trp | Lys | Glu | Pro | Leu | Asn | Thr | Thr | Trp | Gly | Lys | Gly | Asp | Trp |     |     |     |
|     | 225 |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |     |     |     |
| gcc | ggg | gg  | tg  | gg  | gc  | tt  | aa  | tt  | ga  | gt  | gg  | aa  | gt  | tt  | ag  | ct  | 768 |     |
| Ala | Gly | Gly | Trp | Gly | Phe | Asn | Phe | Glu | Val | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Leu |     |     |     |
|     | 245 |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |     |     |     |     |     |     |     |
| aat | gca | ga  | gg  | ta  | gt  | ga  | ga  | gg  | ga  | ta  | tt  | ca  | ta  | ac  | ctc | gg  | 816 |     |
| Asn | Ala | Glu | Gly | Tyr | Ser | Glu | Asp | Gly | Glu | Ile | Phe | Ile | Thr | Leu | Gly |     |     |     |
|     | 260 |     |     |     | 265 |     |     |     |     |     | 270 |     |     |     |     |     |     |     |
| gct | ga  | gg  | tg  | gg  | ga  | cc  | at  | gt  | tt  | cct | ca  | gt  | tc  | tcc | tct | at  | cgc | 864 |
| Ala | Glu | Gly | Ser | Gly | Leu | Pro | Ile | Val | Pro | Gln | Val | Ser | Ser | Ile | Arg |     |     |     |
|     | 275 |     |     |     | 280 |     |     |     |     |     | 285 |     |     |     |     |     |     |     |
| gat | atg | ctg | tgg | gt  | ac  | gg  | aa  | gt  | ac  | aa  | at  | ga  | gg  | tct | gt  | ac  | 912 |     |
| Asp | Met | Leu | Trp | Val | Thr | Gly | Asn | Val | Thr | Asn | Asp | Gly | Ser | Val | Thr |     |     |     |
|     | 290 |     |     |     | 295 |     |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |     |     |     |

|   |      |     |     |
|---|------|-----|-----|
| ttc aag cca acc atg gcg ggt gtg ctt gac tgg ggc gtg tcg gca tat | 960  |     |     |
| Phe Lys Pro Thr Met Ala Gly Val Leu Asp Trp Gly Val Ser Ala Tyr |      |     |     |
| 305   | 310  | 315 | 320 |
| gct gct gca ggc aag atc ttg ccg gcc agc tct cag gca tcc aca aag | 1008 |     |     |
| Ala Ala Ala Gly Lys Ile Leu Pro Ala Ser Ser Gln Ala Ser Thr Lys |      |     |     |
| 325   | 330  | 335 |     |
| agc ggt gcc ccc gat cgg ttc att tcc tat gtc tgg ctc act gga gat | 1056 |     |     |
| Ser Gly Ala Pro Asp Arg Phe Ile Ser Tyr Val Trp Leu Thr Gly Asp |      |     |     |
| 340   | 345  | 350 |     |
| cta ttc gag caa gtg aaa gga ttc cct acc gct caa caa aac tgg acc | 1104 |     |     |
| Leu Phe Glu Gln Val Lys Gly Phe Pro Thr Ala Gln Gln Asn Trp Thr |      |     |     |
| 355   | 360  | 365 |     |
| ggg gcc ctc tta ctg ccg cga gag ctg aat gtc cgc act atc tct aac | 1152 |     |     |
| Gly Ala Leu Leu Leu Pro Arg Glu Leu Asn Val Arg Thr Ile Ser Asn |      |     |     |
| 370   | 375  | 380 |     |
| gtg gtg gat aac gaa ctt tcg cgt gag tcc ttg aca tcg tgg cgc gtg | 1200 |     |     |
| Val Val Asp Asn Glu Leu Ser Arg Glu Ser Leu Thr Ser Trp Arg Val |      |     |     |
| 385   | 390  | 395 | 400 |
| gcc cgc gaa gac tct ggt cag atc gac ctt gaa aca atg gga atc tca | 1248 |     |     |
| Ala Arg Glu Asp Ser Gly Gln Ile Asp Leu Glu Thr Met Gly Ile Ser |      |     |     |
| 405   | 410  | 415 |     |
| att tcc agg gag act tac agc gct ctc aca tcc ggc tca tct ttt gtc | 1296 |     |     |
| Ile Ser Arg Glu Thr Tyr Ser Ala Leu Thr Ser Gly Ser Ser Phe Val |      |     |     |
| 420   | 425  | 430 |     |
| gag tct ggt aaa acg ttg tcg aat gct gga gca gtg ccc ttc aat acc | 1344 |     |     |
| Glu Ser Gly Lys Thr Leu Ser Asn Ala Gly Ala Val Pro Phe Asn Thr |      |     |     |
| 435   | 440  | 445 |     |
| tca ccc tca agc aag ttc ttc gtg ctg aca gca aat ata tct ttc ccg | 1392 |     |     |
| Ser Pro Ser Ser Lys Phe Phe Val Leu Thr Ala Asn Ile Ser Phe Pro |      |     |     |
| 450   | 455  | 460 |     |
| acc tct gcc cgt gac tct ggc atc cag gct ggt ttc cag gtt tta tcc | 1440 |     |     |
| Thr Ser Ala Arg Asp Ser Gly Ile Gln Ala Gly Phe Gln Val Leu Ser |      |     |     |
| 465   | 470  | 475 | 480 |
| tct agt ctt gag tct aca act atc tac tac caa ttc tcc aac gag tcc | 1488 |     |     |
| Ser Ser Leu Glu Ser Thr Thr Ile Tyr Tyr Gln Phe Ser Asn Glu Ser |      |     |     |
| 485   | 490  | 495 |     |
| atc atc gtc gac cgc agc aac acg agt gct gcg gcg aga aca act gct | 1536 |     |     |
| Ile Ile Val Asp Arg Ser Asn Thr Ser Ala Ala Ala Arg Thr Thr Ala |      |     |     |

500

505

510

g g g a t c c t c a g t g a t a a c g a g g c g g g a c g t c t g c g c c t c t t c g a c g t g 1584  
 Gly Ile Leu Ser Asp Asn Glu Ala Gly Arg Leu Arg Leu Phe Asp Val  
 515 520 525

t t g c g a a a t g g a a a a g a a c a g g t t g a a a c t t t g g a g a c t c a c t a t c g t g 1632  
 Leu Arg Asn Gly Lys Glu Gln Val Glu Thr Leu Glu Leu Thr Ile Val  
 530 535 540

g t g g a t a a t a g t g t a c t g g a a g t a t a t g c c a a t g g a c g c t t t g c t c t a 1680  
 Val Asp Asn Ser Val Leu Glu Val Tyr Ala Asn Gly Arg Phe Ala Leu  
 545 550 555 560

g g c a c t t g g g c t c g g t c t t g g t a c g c a a c t c g a c t a a a a t t a a c t t c 1728  
 Gly Thr Trp Ala Arg Ser Trp Tyr Ala Asn Ser Thr Lys Ile Asn Phe  
 565 570 575

t t c c a t a a c g g c g t g g g a a g c g a c a t t c g a a a g a t g t g a c g g t c t t t 1776  
 Phe His Asn Gly Val Gly Glu Ala Thr Phe Glu Asp Val Thr Val Phe  
 580 585 590

g a a g g a c t g t a t g a t g c c t g g c c a c a a g g a a g 1809  
 Glu Gly Leu Tyr Asp Ala Trp Pro Gln Arg Lys  
 595 600

<210> 4  
 <211> 603  
 <212> PRT  
 <213> Penicillium roqueforti

<400> 4  
 Val Asp Phe His Thr Pro Ile Asp Tyr Asn Ser Ala Pro Pro Asn Leu  
 1 5 10 15

Ser Thr Leu Ala Asn Ala Ser Leu Phe Lys Thr Trp Arg Pro Arg Ala  
 20 25 30

His Leu Leu Pro Pro Ser Gly Asn Ile Gly Asp Pro Cys Gly His Tyr  
 35 40 45

Thr Asp Pro Lys Thr Gly Leu Phe His Val Gly Trp Leu Tyr Ser Gly  
 50 55 60

Ile Ser Gly Ala Thr Thr Asp Asp Leu Val Thr Tyr Lys Asp Leu Asn  
 65 70 75 80

Pro Asp Gly Ala Pro Ser Ile Val Ala Gly Gly Lys Asn Asp Pro Leu  
 85 90 95

Ser Val Phe Asp Gly Ser Val Ile Pro Ser Gly Ile Asp Gly Met Pro  
100 105 110

Thr Leu Leu Tyr Thr Ser Val Ser Tyr Leu Pro Ile His Trp Ser Ile  
115 120 125

Pro Tyr Thr Arg Gly Ser Glu Thr Gln Ser Leu Ala Val Ser Tyr Asp  
130 135 140

Gly Gly His Asn Phe Thr Lys Leu Asn Gln Gly Pro Val Ile Pro Thr  
145 150 155 160

Pro Pro Phe Ala Leu Asn Val Thr Ala Phe Arg Asp Pro Tyr Val Phe  
165 170 175

Gln Ser Pro Ile Leu Asp Lys Ser Val Asn Ser Thr Gln Gly Thr Trp  
180 185 190

Tyr Val Ala Ile Ser Gly Gly Val His Gly Val Gly Pro Cys Gln Phe  
195 200 205

Leu Tyr Arg Gln Asn Asp Ala Asp Phe Gln Tyr Trp Glu Tyr Leu Gly  
210 215 220

Gln Trp Trp Lys Glu Pro Leu Asn Thr Thr Trp Gly Lys Gly Asp Trp  
225 230 235 240

Ala Gly Gly Trp Gly Phe Asn Phe Glu Val Gly Asn Val Phe Ser Leu  
245 250 255

Asn Ala Glu Gly Tyr Ser Glu Asp Gly Glu Ile Phe Ile Thr Leu Gly  
260 265 270

Ala Glu Gly Ser Gly Leu Pro Ile Val Pro Gln Val Ser Ser Ile Arg  
275 280 285

Asp Met Leu Trp Val Thr Gly Asn Val Thr Asn Asp Gly Ser Val Thr  
290 295 300

Phe Lys Pro Thr Met Ala Gly Val Leu Asp Trp Gly Val Ser Ala Tyr  
305 310 315 320

Ala Ala Ala Gly Lys Ile Leu Pro Ala Ser Ser Gln Ala Ser Thr Lys  
325 330 335

Ser Gly Ala Pro Asp Arg Phe Ile Ser Tyr Val Trp Leu Thr Gly Asp  
340 345 350

Leu Phe Glu Gln Val Lys Gly Phe Pro Thr Ala Gln Gln Asn Trp Thr

355

360

365

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Ala | Leu | Leu | Leu | Pro | Arg | Glu | Leu | Asn | Val | Arg | Thr | Ile | Ser | Asn |
| 370 |     |     |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |
| Val | Val | Asp | Asn | Glu | Leu | Ser | Arg | Glu | Ser | Leu | Thr | Ser | Trp | Arg | Val |
| 385 |     |     |     | 390 |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |     |     |
| Ala | Arg | Glu | Asp | Ser | Gly | Gln | Ile | Asp | Leu | Glu | Thr | Met | Gly | Ile | Ser |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |     |
| Ile | Ser | Arg | Glu | Thr | Tyr | Ser | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Ser | Ser | Phe | Val |
|     |     |     |     | 420 |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |
| Glu | Ser | Gly | Lys | Thr | Leu | Ser | Asn | Ala | Gly | Ala | Val | Pro | Phe | Asn | Thr |
|     |     |     |     | 435 |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Ser | Pro | Ser | Ser | Lys | Phe | Phe | Val | Leu | Thr | Ala | Asn | Ile | Ser | Phe | Pro |
|     |     |     |     | 450 |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |
| Thr | Ser | Ala | Arg | Asp | Ser | Gly | Ile | Gln | Ala | Gly | Phe | Gln | Val | Leu | Ser |
|     |     |     |     | 465 |     | 470 |     |     |     | 475 |     |     | 480 |     |     |
| Ser | Ser | Leu | Glu | Ser | Thr | Thr | Ile | Tyr | Tyr | Gln | Phe | Ser | Asn | Glu | Ser |
|     |     |     |     | 485 |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |     |     |
| Ile | Ile | Val | Asp | Arg | Ser | Asn | Thr | Ser | Ala | Ala | Ala | Arg | Thr | Thr | Ala |
|     |     |     |     | 500 |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |     |
| Gly | Ile | Leu | Ser | Asp | Asn | Glu | Ala | Gly | Arg | Leu | Arg | Leu | Phe | Asp | Val |
|     |     |     |     | 515 |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |
| Leu | Arg | Asn | Gly | Lys | Glu | Gln | Val | Glu | Thr | Leu | Glu | Leu | Thr | Ile | Val |
|     |     |     |     | 530 |     |     | 535 |     |     |     | 540 |     |     |     |     |
| Val | Asp | Asn | Ser | Val | Leu | Glu | Val | Tyr | Ala | Asn | Gly | Arg | Phe | Ala | Leu |
|     |     |     |     | 545 |     |     | 550 |     |     |     | 555 |     |     | 560 |     |
| Gly | Thr | Trp | Ala | Arg | Ser | Trp | Tyr | Ala | Asn | Ser | Thr | Lys | Ile | Asn | Phe |
|     |     |     |     | 565 |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |     |     |
| Phe | His | Asn | Gly | Val | Gly | Glu | Ala | Thr | Phe | Glu | Asp | Val | Thr | Val | Phe |
|     |     |     |     | 580 |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |     |
| Glu | Gly | Leu | Tyr | Asp | Ala | Trp | Pro | Gln | Arg | Lys |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     | 595 |     |     | 600 |     |     |     |     |     |     |     |     |

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 1839

<212> DNA

<213> Scopulariopsis brevicaulis

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1839)

<400> 5

caa cct acg tct ctg tca atc gac aat tcc acg tat cct tct atc gac 48  
Gln Pro Thr Ser Leu Ser Ile Asp Asn Ser Thr Tyr Pro Ser Ile Asp  
1 5 10 15

tac aac tcc gcc cct cca aac ctc tcg act ctt gcc aac aac agc ctc 96  
Tyr Asn Ser Ala Pro Pro Asn Leu Ser Thr Leu Ala Asn Asn Ser Leu  
20 25 30

ttc gag aca tgg agg ccg agg gca cac gtc ctt ccg ccc cag aac cag 144  
Phe Glu Thr Trp Arg Pro Arg Ala His Val Leu Pro Pro Gln Asn Gln  
35 40 45

atc ggc gat ccg tgt atg cac tac acc gac ccc gag aca gga atc ttc 192  
Ile Gly Asp Pro Cys Met His Tyr Thr Asp Pro Glu Thr Gly Ile Phe  
50 55 60

cac gtc ggc tgg ctg tac aac ggc aat ggc gct tcc ggc gcc acg acc 240  
His Val Gly Trp Leu Tyr Asn Gly Asn Gly Ala Ser Gly Ala Thr Thr  
65 70 75 80

gag gat ctc gtc acc tat cag gat ctc aac ccc gac gga gcg cag atg 288  
Glu Asp Leu Val Thr Tyr Gln Asp Leu Asn Pro Asp Gly Ala Gln Met  
85 90 95

atc ctt ccg ggt ggt gtg aat gac ccc att gct gtc ttt gac ggc gcg 336  
Ile Leu Pro Gly Gly Val Asn Asp Pro Ile Ala Val Phe Asp Gly Ala  
100 105 110

gtt att ccc agt ggc att gat ggg aaa ccc acc atg atg tat acc tcg 384  
Val Ile Pro Ser Gly Ile Asp Gly Lys Pro Thr Met Met Tyr Thr Ser  
115 120 125

gtg tca tac atg ccc atc tcc tgg agc atc gct tac acc agg gga agc 432  
Val Ser Tyr Met Pro Ile Ser Trp Ser Ile Ala Tyr Thr Arg Gly Ser  
130 135 140

gag acc cac tct ctc gca gtg tcg tcc gac ggc ggt aag aac ttc acc 480  
Glu Thr His Ser Leu Ala Val Ser Ser Asp Gly Gly Lys Asn Phe Thr  
145 150 155 160

aag ctg gtg cag ggc ccc gtc att cct tcg cct ccc ttc ggc gcc aac 528  
Lys Leu Val Gln Gly Pro Val Ile Pro Ser Pro Pro Phe Gly Ala Asn

165

170

175

|   |      |     |     |
|---|------|-----|-----|
| gtg acc agc tgg cgt gac ccc ttc ctg ttc caa aac ccc cag ttc gac | 576  |     |     |
| Val Thr Ser Trp Arg Asp Pro Phe Leu Phe Gln Asn Pro Gln Phe Asp |      |     |     |
| 180   | 185  | 190 |     |
| tct ctc ctc gaa agc gag aac ggc acg tgg tac acc gtt atc tct ggt | 624  |     |     |
| Ser Leu Leu Glu Ser Glu Asn Gly Thr Trp Tyr Thr Val Ile Ser Gly |      |     |     |
| 195   | 200  | 205 |     |
| ggc atc cac ggt gac ggc ccc tcc gcg ttc ctc tac cgt cag cac gac | 672  |     |     |
| Gly Ile His Gly Asp Gly Pro Ser Ala Phe Leu Tyr Arg Gln His Asp |      |     |     |
| 210   | 215  | 220 |     |
| ccc gac ttc cag tac tgg gag tac ctt gga ccg tgg tgg aac gag gaa | 720  |     |     |
| Pro Asp Phe Gln Tyr Trp Glu Tyr Leu Gly Pro Trp Trp Asn Glu Glu |      |     |     |
| 225   | 230  | 235 | 240 |
| ggg aac tcg acc tgg ggc agc ggt gac tgg gct ggc cgg tgg ggc tac | 768  |     |     |
| Gly Asn Ser Thr Trp Gly Ser Gly Asp Trp Ala Gly Arg Trp Gly Tyr |      |     |     |
| 245   | 250  | 255 |     |
| aac ttc gag gtc atc aac att gtc ggt ctt gac gat gat ggc tac aac | 816  |     |     |
| Asn Phe Glu Val Ile Asn Ile Val Gly Leu Asp Asp Asp Gly Tyr Asn |      |     |     |
| 260   | 265  | 270 |     |
| ccc gac ggt gaa atc ttt gcc acg gta ggt acc gaa tgg tcg ttt gac | 864  |     |     |
| Pro Asp Gly Glu Ile Phe Ala Thr Val Gly Thr Glu Trp Ser Phe Asp |      |     |     |
| 275   | 280  | 285 |     |
| ccc atc aaa ccg cag gcc tcg gac aac agg gag atg ctc tgg gcc gcg | 912  |     |     |
| Pro Ile Lys Pro Gln Ala Ser Asp Asn Arg Glu Met Leu Trp Ala Ala |      |     |     |
| 290   | 295  | 300 |     |
| gac aac atg act ctc gag gac ggc gat atc aag ttc acg cca agc atg | 960  |     |     |
| Gly Asn Met Thr Leu Glu Asp Gly Asp Ile Lys Phe Thr Pro Ser Met |      |     |     |
| 305   | 310  | 315 | 320 |
| gcg ggc tac ctc gac tgg ggt cta tcg gcg tat gcc gcc gct ggc aag | 1008 |     |     |
| Ala Gly Tyr Leu Asp Trp Gly Leu Ser Ala Tyr Ala Ala Gly Lys     |      |     |     |
| 325   | 330  | 335 |     |
| gag ctg ccc gct tct tca aag cct tcg cag aag agc ggt gcg ccg gac | 1056 |     |     |
| Glu Leu Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ser Gln Lys Ser Gly Ala Pro Asp |      |     |     |
| 340   | 345  | 350 |     |
| cgg ttc gtg tcg tac ctg tgg ctc acc ggt gac tac ttc gag ggc cac | 1104 |     |     |
| Arg Phe Val Ser Tyr Leu Trp Leu Thr Gly Asp Tyr Phe Glu Gly His |      |     |     |
| 355   | 360  | 365 |     |

|     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|--|
| gac | ttc | ccc | acc  | ccg | cag | cag | aat | tgg  | acc | ggc | tcg | ctt | ttg | ctt | ccg | 1152 |  |
| Asp | Phe | Pro | Thr  | Pro | Gln | Gln | Asn | Trp  | Thr | Gly | Ser | Leu | Leu | Leu | Pro |      |  |
| 370 |     |     |      |     | 375 |     |     |      |     |     | 380 |     |     |     |     |      |  |
| cgt | gag | ctg | agc  | gtc | ggg | acg | att | ccc  | aac | gtt | gtc | gac | aac | gag | ctt | 1200 |  |
| Arg | Glu | Leu | Ser  | Val | Gly | Thr | Ile | Pro  | Asn | Val | Val | Asp | Asn | Glu | Leu |      |  |
| 385 |     |     |      |     | 390 |     |     |      |     | 395 |     |     |     |     | 400 |      |  |
| gct | cgc | gag | acg  | ggc | tct | tgg | agg | gtt  | ggc | acc | aac | gac | act | ggc | gtg | 1248 |  |
| Ala | Arg | Glu | Thr  | Gly | Ser | Trp | Arg | Val  | Gly | Thr | Asn | Asp | Thr | Gly | Val |      |  |
|     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
| 405 |     |     |      |     |     |     |     |      |     | 410 |     |     |     |     | 415 |      |  |
| ctt | gag | ctg | gtc  | act | ctg | aag | cag | gag  | att | gct | cgc | gag | acg | ctg | gct | 1296 |  |
| Leu | Glu | Leu | Val  | Thr | Leu | Lys | Gln | Glut | Ile | Ala | Arg | Glu | Thr | Leu | Ala |      |  |
|     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
| 420 |     |     |      |     |     |     |     |      | 425 |     |     |     |     | 430 |     |      |  |
| gaa | atg | acc | agc  | ggc | aac | tcc | ttc | acc  | gag | gcg | agc | agg | aat | gtc | agc | 1344 |  |
| Glu | Met | Thr | Ser  | Gly | Asn | Ser | Phe | Thr  | Glu | Ala | Ser | Arg | Asn | Val | Ser |      |  |
|     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
| 435 |     |     |      |     |     |     |     |      | 440 |     |     |     |     | 445 |     |      |  |
| tcg | ccc | gga | tct  | acc | gcc | ttc | cag | cag  | tcc | ctg | gat | tcc | aag | ttc | ttc | 1392 |  |
| Ser | Pro | Gly | Ser  | Thr | Ala | Phe | Gln | Gln  | Ser | Leu | Asp | Ser | Lys | Phe | Phe |      |  |
|     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
| 450 |     |     |      |     |     |     |     |      | 455 |     |     |     |     | 460 |     |      |  |
| gtc | ctg | acc | gcc  | tcg | ctc | tcc | ttc | cct  | tcg | tcg | gct | cgc | gac | tcc | gac | 1440 |  |
| Val | Leu | Thr | Ala  | Ser | Leu | Ser | Phe | Pro  | Ser | Ser | Ala | Arg | Asp | Ser | Asp |      |  |
|     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
| 465 |     |     |      |     |     |     |     |      | 470 |     |     |     |     | 475 |     | 480  |  |
| ctc | aag | gct | ggt  | ttc | gag | atc | ctg | tcg  | tcc | gag | ttt | gag | tcg | acc | acg | 1488 |  |
| Leu | Lys | Ala | Gly  | Phe | Glu | Ile | Leu | Ser  | Ser | Glu | Phe | Glu | Ser | Thr | Thr |      |  |
|     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
| 485 |     |     |      |     |     |     |     |      |     | 490 |     |     |     |     | 495 |      |  |
| gtc | taa | taa | caaa | ttt | tcc | aaa | gag | tcc  | atc | atc | att | gac | cgg | agc | aac | 1536 |  |
| Val | Tyr | Tyr | Gln  | Phe | Ser | Asn | Glu | Ser  | Ile | Ile | Ile | Asp | Arg | Ser | Asn |      |  |
|     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
| 500 |     |     |      |     |     |     |     |      | 505 |     |     |     |     | 510 |     |      |  |
| tcg | agt | gct | gcc  | gcc | ttg | act | acc | gat  | gga | atc | gac | acc | cgc | aac | gag | 1584 |  |
| Ser | Ser | Ala | Ala  | Ala | Leu | Thr | Thr | Asp  | Gly | Ile | Asp | Thr | Arg | Asn | Glu |      |  |
|     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
| 515 |     |     |      |     |     |     |     |      | 520 |     |     |     |     | 525 |     |      |  |
| ttt | ggc | aag | atg  | cgc | ctg | ttt | gat | gtt  | gtc | gag | ggt | gac | cag | gag | cgt | 1632 |  |
| Phe | Gly | Lys | Met  | Arg | Leu | Phe | Asp | Val  | Val | Glu | Gly | Asp | Gln | Glu | Arg |      |  |
|     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
| 530 |     |     |      |     |     |     |     |      | 535 |     |     |     |     | 540 |     |      |  |
| atc | gag | acg | ctc  | gat | ctc | act | att | gtg  | gtt | gat | aac | tcg | atc | gtt | gag | 1680 |  |
| Ile | Glu | Thr | Leu  | Asp | Leu | Thr | Ile | Val  | Val | Asp | Asn | Ser | Ile | Val | Glu |      |  |
|     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
| 545 |     |     |      |     |     |     |     |      | 550 |     |     |     |     | 555 |     | 560  |  |
| gtt | cat | gcc | aac  | ggg | cga | ttc | gct | ctg  | agc | act | tgg | gtt | cgt | tcg | tgg | 1728 |  |
| Val | His | Ala | Asn  | Gly | Arg | Phe | Ala | Leu  | Ser | Thr | Trp | Val | Arg | Ser | Trp |      |  |

565

570

575

tac gag tcg tcc aag gac atc aag ttc ttc cac gat ggc gac agc acg 1776  
 Tyr Glu Ser Ser Lys Asp Ile Lys Phe Phe His Asp Gly Asp Ser Thr  
 580 585 590

gtt cag ttc tcg aac atc acc gtc tac gag gga ctg ttt gac gcc tgg 1824  
 Val Gln Phe Ser Asn Ile Thr Val Tyr Glu Gly Leu Phe Asp Ala Trp  
 595 600 605

ccg gag cgg gcc agg 1839  
 Pro Glu Arg Ala Arg  
 610

<210> 6  
 <211> 613  
 <212> PRT  
 <213> *Scopulariopsis brevicaulis*

<400> 6  
 Gln Pro Thr Ser Leu Ser Ile Asp Asn Ser Thr Tyr Pro Ser Ile Asp  
 1 5 10 15

Tyr Asn Ser Ala Pro Pro Asn Leu Ser Thr Leu Ala Asn Asn Ser Leu  
 20 25 30

Phe Glu Thr Trp Arg Pro Arg Ala His Val Leu Pro Pro Gln Asn Gln  
 35 40 45

Ile Gly Asp Pro Cys Met His Tyr Thr Asp Pro Glu Thr Gly Ile Phe  
 50 55 60

His Val Gly Trp Leu Tyr Asn Gly Asn Gly Ala Ser Gly Ala Thr Thr  
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Val Thr Tyr Gln Asp Leu Asn Pro Asp Gly Ala Gln Met  
 85 90 95

Ile Leu Pro Gly Gly Val Asn Asp Pro Ile Ala Val Phe Asp Gly Ala  
 100 105 110

Val Ile Pro Ser Gly Ile Asp Gly Lys Pro Thr Met Met Tyr Thr Ser  
 115 120 125

Val Ser Tyr Met Pro Ile Ser Trp Ser Ile Ala Tyr Thr Arg Gly Ser  
 130 135 140

Glu Thr His Ser Leu Ala Val Ser Ser Asp Gly Gly Lys Asn Phe Thr  
 145 150 155 160

Lys Leu Val Gln Gly Pro Val Ile Pro Ser Pro Pro Phe Gly Ala Asn  
165 170 175

Val Thr Ser Trp Arg Asp Pro Phe Leu Phe Gln Asn Pro Gln Phe Asp  
180 185 190

Ser Leu Leu Glu Ser Glu Asn Gly Thr Trp Tyr Thr Val Ile Ser Gly  
195 200 205

Gly Ile His Gly Asp Gly Pro Ser Ala Phe Leu Tyr Arg Gln His Asp  
210 215 220

Pro Asp Phe Gln Tyr Trp Glu Tyr Leu Gly Pro Trp Trp Asn Glu Glu  
225 230 235 240

Gly Asn Ser Thr Trp Gly Ser Gly Asp Trp Ala Gly Arg Trp Gly Tyr  
245 250 255

Asn Phe Glu Val Ile Asn Ile Val Gly Leu Asp Asp Asp Gly Tyr Asn  
260 265 270

Pro Asp Gly Glu Ile Phe Ala Thr Val Gly Thr Glu Trp Ser Phe Asp  
275 280 285

Pro Ile Lys Pro Gln Ala Ser Asp Asn Arg Glu Met Leu Trp Ala Ala  
290 295 300

Gly Asn Met Thr Leu Glu Asp Gly Asp Ile Lys Phe Thr Pro Ser Met  
305 310 315 320

Ala Gly Tyr Leu Asp Trp Gly Leu Ser Ala Tyr Ala Ala Ala Gly Lys  
325 330 335

Glu Leu Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ser Gln Lys Ser Gly Ala Pro Asp  
340 345 350

Arg Phe Val Ser Tyr Leu Trp Leu Thr Gly Asp Tyr Phe Glu Gly His  
355 360 365

Asp Phe Pro Thr Pro Gln Gln Asn Trp Thr Gly Ser Leu Leu Leu Pro  
370 375 380

Arg Glu Leu Ser Val Gly Thr Ile Pro Asn Val Val Asp Asn Glu Leu  
385 390 395 400

Ala Arg Glu Thr Gly Ser Trp Arg Val Gly Thr Asn Asp Thr Gly Val  
405 410 415

Leu Glu Leu Val Thr Leu Lys Gln Glu Ile Ala Arg Glu Thr Leu Ala

420

425

430

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Glu | Met | Thr | Ser | Gly | Asn | Ser | Phe | Thr | Glu | Ala | Ser | Arg | Asn | Val | Ser |  |
| 435 |     |     |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |  |
| Ser | Pro | Gly | Ser | Thr | Ala | Phe | Gln | Gln | Ser | Leu | Asp | Ser | Lys | Phe | Phe |  |
| 450 |     |     |     |     |     |     | 455 |     |     |     | 460 |     |     |     |     |  |
| Val | Leu | Thr | Ala | Ser | Leu | Ser | Phe | Pro | Ser | Ser | Ala | Arg | Asp | Ser | Asp |  |
| 465 |     |     |     |     |     |     | 470 |     |     |     | 475 |     |     |     | 480 |  |
| Leu | Lys | Ala | Gly | Phe | Glu | Ile | Leu | Ser | Ser | Glu | Phe | Glu | Ser | Thr | Thr |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 495 |     |  |
| 485 |     |     |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Val | Tyr | Tyr | Gln | Phe | Ser | Asn | Glu | Ser | Ile | Ile | Ile | Asp | Arg | Ser | Asn |  |
|     |     |     |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     |     |     |     | 510 |  |
| Ser | Ser | Ala | Ala | Ala | Leu | Thr | Thr | Asp | Gly | Ile | Asp | Thr | Arg | Asn | Glu |  |
|     |     |     |     |     |     |     | 515 |     |     |     |     |     |     | 525 |     |  |
| Phe | Gly | Lys | Met | Arg | Leu | Phe | Asp | Val | Val | Glu | Gly | Asp | Gln | Glu | Arg |  |
|     |     |     |     |     |     |     | 530 |     |     |     | 535 |     |     |     | 540 |  |
| Ile | Glu | Thr | Leu | Asp | Leu | Thr | Ile | Val | Val | Asp | Asn | Ser | Ile | Val | Glu |  |
|     |     |     |     |     |     |     | 545 |     |     |     | 550 |     |     |     | 560 |  |
| Val | His | Ala | Asn | Gly | Arg | Phe | Ala | Leu | Ser | Thr | Trp | Val | Arg | Ser | Trp |  |
|     |     |     |     |     |     |     | 565 |     |     |     | 570 |     |     |     | 575 |  |
| Tyr | Glu | Ser | Ser | Lys | Asp | Ile | Lys | Phe | Phe | His | Asp | Gly | Asp | Ser | Thr |  |
|     |     |     |     |     |     |     | 580 |     |     |     | 585 |     |     |     | 590 |  |
| Val | Gln | Phe | Ser | Asn | Ile | Thr | Val | Tyr | Glu | Gly | Leu | Phe | Asp | Ala | Trp |  |
|     |     |     |     |     |     |     | 595 |     |     |     | 600 |     |     |     | 605 |  |
| Pro | Glu | Arg | Ala | Arg |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| 610 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Primer

&lt;400&gt; 7

g c g a a t t c a t g a a g c t c a c c a c t a c c a

<210> 8  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 8  
gcggatcccg gtcaatttct ct 22

<210> 9  
<211> 9  
<212> DNA  
<213> *Aspergillus niger*

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(9)

$\langle 400 \rangle$  9  
 g a c g a g g a c  
 Asp Glu Asp  
 1

<210> 10  
<211> 9  
<212> DNA  
<213> *Aspergillus niger*

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(9)

|   |   |
|---|---|
| $\langle 400 \rangle$ 10<br>t t c c t g c c c<br>Phe Leu Pro<br>l | 9 |
|---|---|

<210> 11  
<211> 9  
<212> DNA  
<213> *Aspergillus niger*

<220>  
<221> CDS

<222> (1).. (9)

<400> 11

t c c a t c c c c  
S e r I l e P r o  
l

9

<210> 12

<211> 9

<212> DNA

<213> Aspergillus niger

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (9)

<400> 12

g c c t t c g a c  
A l a P h e A s p  
l

9

<210> 13

<211> 9

<212> DNA

<213> Aspergillus niger

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (9)

<400> 13

g t g t a c g g c  
V a l T y r G l y  
l

9

<210> 14

<211> 9

<212> DNA

<213> Aspergillus niger

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (9)

<400> 14

g c c c t g c a g  
A l a L e u G l n

9

<210> 15  
 <211> 9  
 <212> DNA  
 <213> Aspergillus niger

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(9)

<400> 15  
 t t t t c g g a g  
 Phe Ser Glu  
 1  
 9

<210> 16  
 <211> 9  
 <212> DNA  
 <213> Aspergillus niger

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(9)

<400> 16  
 a t c g a c g a c  
 Ile Asp Asp  
 1  
 9

<210> 17  
 <211> 9  
 <212> DNA  
 <213> Aspergillus niger

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(9)

<400> 17  
 t t g a t g g g c  
 Leu Met Gly  
 1  
 9

<210> 18  
 <211> 9

<212> DNA

<213> Aspergillus niger

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(9)

<400> 18

g t c t g c t t g

Val Cys Leu

1

9

【書類名】要約書

【要約】

【課題】 フラクトオリゴ糖の製造に適するように反応特性が改善された  $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体の提供。

【解決手段】 本発明によれば、特定のアミノ酸残基において変異を有する配列番号2に記載のアミノ酸配列またはその相同体からなる、 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体が提供される。

【選択図】 なし

出願人履歴

0 0 0 0 6 0 9 1

19900803

新規登録

東京都中央区京橋2丁目4番16号

明治製菓株式会社